

Ginsenoside Rg3 에 의한 3D 피부 모델의 장벽 기능 강화 및 지질 패킹 구조 개선에 관한 연구

김선영^{*} · 이설훈^{**†}

^{*}한국인삼공사

^{**}동덕여자대학교 화학-화장품 학부, 교수

(2023년 10월 11일 접수, 2023년 12월 5일 수정, 2023년 12월 5일 채택)

A Study on the Enhancement of Barrier Function and Improvement of Lipid Packing Structure in a 3D Skin Model by Ginsenoside Rg3

Sunyoung Kim¹ and Seol-Hoon Lee^{2,†}

¹Korea Ginseng Corporation Research Institute, 71 Beotkkot-gil, Daedeok-gu, Daejeon 34337, Korea

²Division of Applied Chemistry and Cosmetic science, Dongduk Women's University

(Received October 11, 2023; Revised December 5, 2023; Accepted December 5, 2023)

요약: 피부의 장벽 구조는 표피의 각질 형성세포의 분화과정에 의해서 생성된다. 이 구조는 케라틴 단백질로 구성되는 각질세포와 그 사이를 채우고 있는 세포간 지질로 구성된다. 이때 표피의 기저층의 세포의 막을 이루던 인지질 등의 성분은 분해되어 없어지고, 세라마이드 등이 성분이 신규로 합성되어 각질층의 세포간 지질을 구성한다. 본 연구에서는 피부 장벽의 세포간 지질 구조의 패킹과 장벽기능에 진세노사이드 Rg3성분이 미치는 영향을 확인하였다. 이를 위해 3D피부 세포의 분화과정에 Rg3성분을 처리하였다. 3D피부를 대상으로 FT-IR 및 TEWL를 분석한 결과, 각질 세포간 지질의 orthorhombic패킹이 강화되고 장벽기능이 강화되는 것을 확인하였다. 또한 HaCaT세포에 Rg3를 처리한 경우, 긴 체인 길이의 지질을 합성하는 EVOL1 및 EVOL4의 발현 증가와 짧은 길이의 세라마이드의 합성을 당하는 CERS6의 감소 그리고 피토스핑고신을 사용하는 세라마이드를 분해시키는 ACER6의 증가를 검출하였다. 이를 통해 Rg3가 표피 분화 과정 중 지질의 합성에 영향을 주어 장벽 기능 변화를 가져올 가능성을 제시하였다.

Abstract: The skin's barrier structure is formed through the differentiation process of epidermal keratinocytes. It consists of corneocytes that are composed of keratin proteins and lipids that fill the spaces between them. During this process, the lipids such as phospholipid that made up the membrane of the basal layer cells of the epidermis are decomposed and replaced with newly synthesized components like ceramide. In this study, the effect of ginsenoside Rg3 components on the packing of the intercellular lipid structure of the skin barrier and the barrier function was confirmed. To confirm this, Rg3 components were treated during the differentiation process of 3D epidermal cells. The FT-IR and TEWL analysis on 3D epidermis showed an enhancement in the orthorhombic lipid packing and an improvement in barrier function. Additionally, in HaCaT cells, an increase in the expression of EVOL1 and EVOL4, which synthesize long-chain lipids, was detected, along with a decrease in CERS6, which synthesizes short-chain ceramide, and an increase in ACER6, which decomposes ceramide using phytosphingosine. This suggests the possibility that Rg3 affects lipid synthesis during the epidermal differentiation process, resulting in changes in barrier function.

Keywords: skin barrier, lipid packing, orthorhombic, ginsenoside, 3D skin

† 주 저자 (e-mail: slashv@dongduk.ac.kr)
call: 02-940-4792

1. 서론

피부는 우리 몸의 가장 큰 기관 중 하나로, 외부 환경으로부터 내부의 조직을 보호하고 수분을 유지하는 중요한 역할을 한다. 이러한 기능은 피부 장벽이라고 불리는 구조를 통해 수행된다[1]. 피부장벽은 각질형성세포와 세포간 지질로 구성되고 장벽의 구조와 기능을 결정한다. 이런 장벽 구조를 구성하기 위해서는 표피의 각질형성 세포가 기저층에서 분화하여 각질층으로 변화하게 된다. 이때 생리활성이 없는 각질층의 세포간 지질 성분은 생리활성을 가지는 기저층의 세포 외벽을 성분과는 완전히 다른 성분으로 구성된다[2]. 기저층의 세포 외벽 지질성분은 세포 내외부의 경계를 구성하고 또한 세포 내외부의 물질이나 신호의 전달에 적합한 구조를 이루게 된다. 이를 위해 주로 인지질 성분으로 구성되고 bilayer 구조를 이루고 있다[3]. 이에 비해서 피부 장벽을 이루는 세포간 지질의 성분은 세라마이드, 콜레스테롤, 자유지방산으로 구성된다. 또한 bilayer 구조가 반복되는 라멜라 구조를 구성한다[4]. 이 세포간 지질층은 주로 피부 외부에서 내부로 이물질의 투과를 억제하고 피부 내부의 수분 손실을 억제하는데 중요한 역할을 한다.

이런 장벽의 세포간 지질성분은 각질 형성세포의 분화 과정에서 새롭게 합성된다. 기저층 세포의 세포막을 구성하는 기존의 지질이 분해되고 새로운 구조인 세라마이드의 합성이 진행된다[3]. 세라마이드는 주로 스프고신 구조에 지방산이 결합되어 형성되고 다양한 세라마이드 합성효소(ceramide synthase)들에 의해서 진행된다. 이 때 사용되는 스프고신의 종류에 의해서 다양한 세라마이드의 구조가 결정된다. 또한 지방산의 길이에 따라서도 세라마이드의 종류가 다양해진다. 이 경우 짧은 길이의 지방산을 이용하여 세라마이드를 형성하는 세라마이드 합성효소가 존재하고 긴 길이의 지방산을 이용하여 세라마이드를 형성하는 합성효소들이 또한 존재한다. 한편, 이때 사용되는 지방산의 길이도 다양한 효소들에 의해서 조절된다. 특히 elongation of very-long-chain-fatty acids 1 (EVOL 1)[5]과 elongation of very-long-chain-fatty acids 4 (EVOL 4)[6] 효소는 긴 길이의 지방산을 합성하는데 중요한 기능을 한다고 알려져 있다. 이와 같이 각질의 분화과정에서 각질층의 지질성분의 합성을 조절하는 다양한 과정이 있을 수 있고 이과정에 변화가 생기면 피부장벽의 기능에 변화를 가져올 수 있다[7]. 예를 들어 피부장벽에 문제가 있다고 판단되는 아토피성 피부를 가지는 환자의 경우 긴 길이의 세

라마이드가 감소하고 짧은 길이의 세라마이드가 증가하는 것이 관찰된다[8]. 또한 ovalbumin에 의해 유도된 피부 면역 과민 반응에서 짧은 길이의 세라마이드를 만드는 CERS6 등의 효소 등이 증가하는 사례도 관찰되고 있다[9]. 또한 세라마이드의 구조 중 스프고신의 비율이 증가하고 피토스핑고신의 비율이 감소하면 장벽의 기능이 강화되는 것이 보고되었다[10]. 이와 같이 각질세포의 분화과정에 미치는 요소와 이로 인해서 변화하는 피부 장벽의 기능을 분석하는 것은 장벽의 형성 기작을 이해하는데 중요한 요소가 된다.

피부의 장벽의 기능은 기본적으로 각질층으로 수분이 증발하는 것을 transepidermal water loss (TEWL) 분석 기기를 이용하여 분석할 수 있다. 추가적으로 fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)을 이용하여 장벽 구조의 packing상태를 추가적으로 확인할 수 있다[11]. 지질성분이 패킹 되어있는 상태는 orthorhombic구조가 가장 안정화 되어있는 형태를 이루고 외부에서의 이물질의 침입이나, 지질성분 조합의 변화에 의해서 hexagonal-liquid구조로 불안정해진다[12]. 이를 통해서 지질구조의 안정성을 추가적으로 확인할 수 있다. 아토피 환자들에게서 얻어진 피부 샘플에서 지질구조의 orthorhombic구조가 약화되는 것이 또한 관찰되고 있다[13].

본 연구에서는 홍삼의 유효성분인 진세노사이드를 대상으로 피부의 장벽 개선 가능성을 조사하였다. 진세노사이드는 OH기의 수에 따라서 protopanaxadiol (PPD)과 protopanaxatriol (PPT)로 나누어진다. 진세노사이드 Rg3 (이후 Rg3)는 PPT의 구조이고 진세노사이드 Rh1 (이후 Rh1)은 PPD의 구조

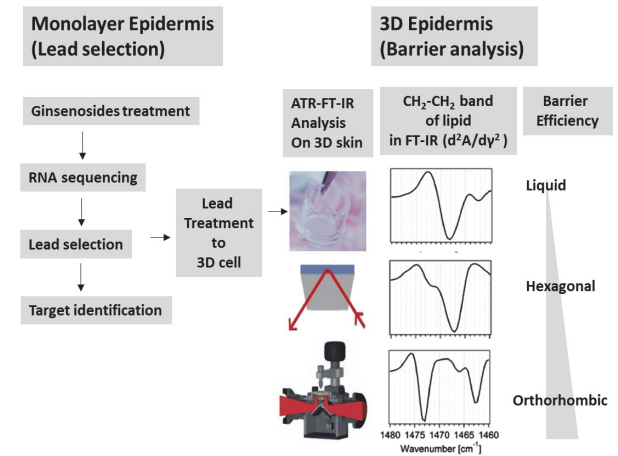


Figure 1. Analysis of the lipid packing status in 3D skin using ATR-FTIR spectroscopy.

로 홍삼의 가공과정에서 생성된다[14]. 이중 Rg3를 대상으로 피부 장벽 개선 가능성을 확인 하려하였다[15,16]. 표피 세포인 HaCaT 세포를 대상으로 q-RT-PCR을 이용하여 주요 지질 관련 효소들의 변화를 검증하여 장벽의 기능에 미치는 생리적인 변화를 확인하려 하였다. 또한 물리적인 장벽의 기능을 확인하기 위해서 3D피부 세포를 이용하였다. 이 시스템을 사용하는 경우 기저층-유극층-과립층-각질층으로 분화하는 과정을 모사할 수 있다. 이를 대상으로 TEWL등을 분석하여 장벽의 기능을 검증할 수 있다. 또한 3D피부가 배양된 멤브레인을 인서트로부터 분리하여 이를 대상으로 각질층의 지질 패킹 구조를 분석할 수 있다(Figure 1).

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 실험재료

Real-time PCR primer인 b-actin (qHsaCEP0036280), ELOVL1 (qHsaCIP0032676), ELOVL4 (qHsaCEP0051037), ACER3 (qHsaCEP0057515), CERS6 (qHsaCEP0054151)와 iTaq™ Universal Probes Supermix, 와 iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit 는 BioRad (USA)사에서 구입하여 사용하였다. Ginsenoside Rg3는 에이스엠자임(Korea)에서 구입하여 사용하였다.

2.2. 세포배양

HaCaT (human, adult, low calcium, high temperature, human adult skin keratinocytes, Addexbio, USA)cells 은 Dulbecco modified Eagle medium (Gibco, USA)에 10% fetal bovine serum과 penicillin-streptomycin을 처리하여 37 °C 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 3D skin 은 EpiTem(표피)시스템을 ROKIT healthcare (Korea) 사용하였다. Insert membrane에 표피 세포를 seeding하고 3D구조로 분화하는 과정은 ROKIT healthcare (Korea)에서 진행하였다. 표피가 분화하는 2 주간, 2 일 마다 측정 시료가 배합된 배양액으로 교체해주었다.

2.3. ATR-FT-IR의 측정 및 해석

3D피부가 있는 membrane을 insert에서 절단하여 30 min 동안 상온에서 건조하였다. 이를 대상으로 5 지점을 대상으로 ART-FT-IR (Jasco 4200, Jasco, Japan)기기로 측정하였다. 이후 1460 ~ 1480 cm⁻¹의 범위에서 2 차 미분 그래프를 작성하였다. 이 때 2 개의 peak (1474/1463)의 local height를 계산하여 상대적인 비율을 수치화 하였다[17].

2.4. TEWL의 측정

3D피부의 insert의 구경에 맞추어 GP skin barrier (GPOWER Inc., Korea)측정 기기를 위치시키고 5 회 측정 한 후 분석하였다.

2.5. 유전자 분석

q-RT-PCR은 CFX96 PCR cycler (BioRad, USA) 기기를 이용하여 분석하였다. Beta-actin에 대한 상대적인 발현 비율을 Cq 으로부터 계산하였다. RNA sequencing은 HaCaT 세포에서 RNeasy (Qiagen, USA)를 통하여 RNA를 확보한 이후 Ebiogen (Korea)사에 분석을 의뢰하여 데이터를 확보하였다.

2.6. 통계처리

모든 샘플은 5 회 반복 측정 후 평균과 표준 편차를 표시하였다. 그룹 간의 통계는 students *t*-test를 이용하였다. 두 구간의 유의적 차이에 대한 통계적 검증 후 **p* < 0.05를 표시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Rg3처리에 의한 3D피부 장벽 기능의 강화

사전 연구에서, 홍삼 가공 과정에서 생성되고 PPT의 구조를 가지는 Rg3와 PPD의 구조를 가지는 Rh1을 대상으로 표피세포(HaCaT)에 처리한 이후 변화되는 유전자의 발현을 확인하기 위해서 RNA sequencing을 진행하였다. 그 결과 표피 세포인 HaCaT세포의 경우 지질 합성을 담당하는 다양한 유전자들이 Rg3에 의해서 변화하는 가능성을 확인할 수 있었다(Data not shown). 이를 통해서 Rg3를 타겟으로 선정하여 본 연구를 실시하였다. 표피의 분화과정에 Rg3의 처리가 미치는 영향을 확인하기 위해서 Rg3를 10 µg/mL과 25 µg/mL을 처리하고 2 주간 배양하였다. 또한 스트레스 상황이나 스테로이드 처리시 장벽의 기능이 악화되는 현상이 보고 되어있어서 하이드로코르티손(hydrocortisone, HDR)을 10 µg/mL과 100 µg/mL처리하여 음성 대조군으로 사용하였다[18]. 대조군은 표피세포 배양 미디어로 별도의 성분을 처리하지 않았다. 각각의 실험군은 2 개씩 배양하였다. 세포 배양이후 insert에서 증발하는 수분의 량을 TEWL meter를 이용하여 5 번 측정하였다. 이들의 평균과 표준편차를 그래프로 나타내었다. 이를 통해서 장벽의 기능을 확인하였다. 그 결과 대조군에서는 35.25 ± 5.35 g/m²/h의 증발량을 나타내었다. 이때 Rg3를 10 µg/mL처리한 경우 및

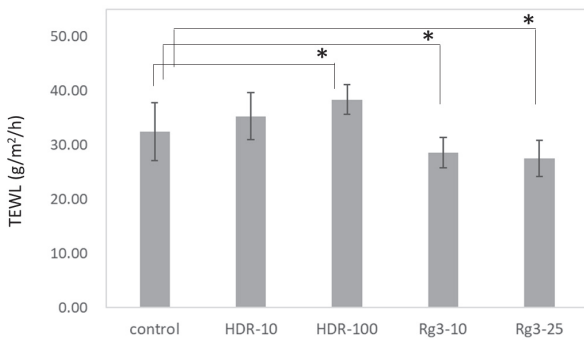


Figure 2. Barrier functions of 3D skin treated with Rg3 or hydrocortisone were analyzed by the TEWL instrument. ($p < 0.05$) 3D skin cultures were treated with hydrocortisone (HDR) at concentrations of 10 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$, Rg3 at concentrations of 10 $\mu\text{g/mL}$ and 25 $\mu\text{g/mL}$. Subsequently, the amount of evaporating moisture from the 3D skin inserts were analyzed with TEWL meter.

25 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리한 경우에는 $28.61 \pm 2.80 \text{ g/m}^2/\text{h}$, $27.49 \pm 3.39 \text{ g/m}^2/\text{h}$ 를 나타내어 TEWL가 모두 유의미하게 감소하는 것을 관찰하였다. 같은 조건에서 하이드로코르티손을 10 $\mu\text{g/mL}$ 과 100 $\mu\text{g/mL}$ 으로 추가 처리한 경우에는 $35.25 \pm 4.31 \text{ g/m}^2/\text{h}$ 및 $38.35 \pm 2.78 \text{ g/m}^2/\text{h}$ 을 나타내었다. 100 $\mu\text{g/mL}$ 을 처리한 경우에 유의미하게 TEWL가 증가하였다 (Figure 2). 이를 통해서 3D 표피가 분화하는 과정에서 Rg3의 영향에 의해서 피부의 장벽 기능이 강화되는 것을 확인하였다. 동일한 조건에서는 하이드로코르티손의 처리에 의해서 TEWL가 증가하여 장벽의 기능이 약화되는 것을 확인할 수 있었다.

3.2. Rg3처리에 의한 3D피부장벽 구조의 강화

Rg3 및 하이드로코르티손의 처리에 의해서 변화한 3D 피부에서의 장벽기능의 변화가 장벽 패킹상태의 변화에 기인한 것인지 확인하기 위해서 3D피부를 대상으로 세포

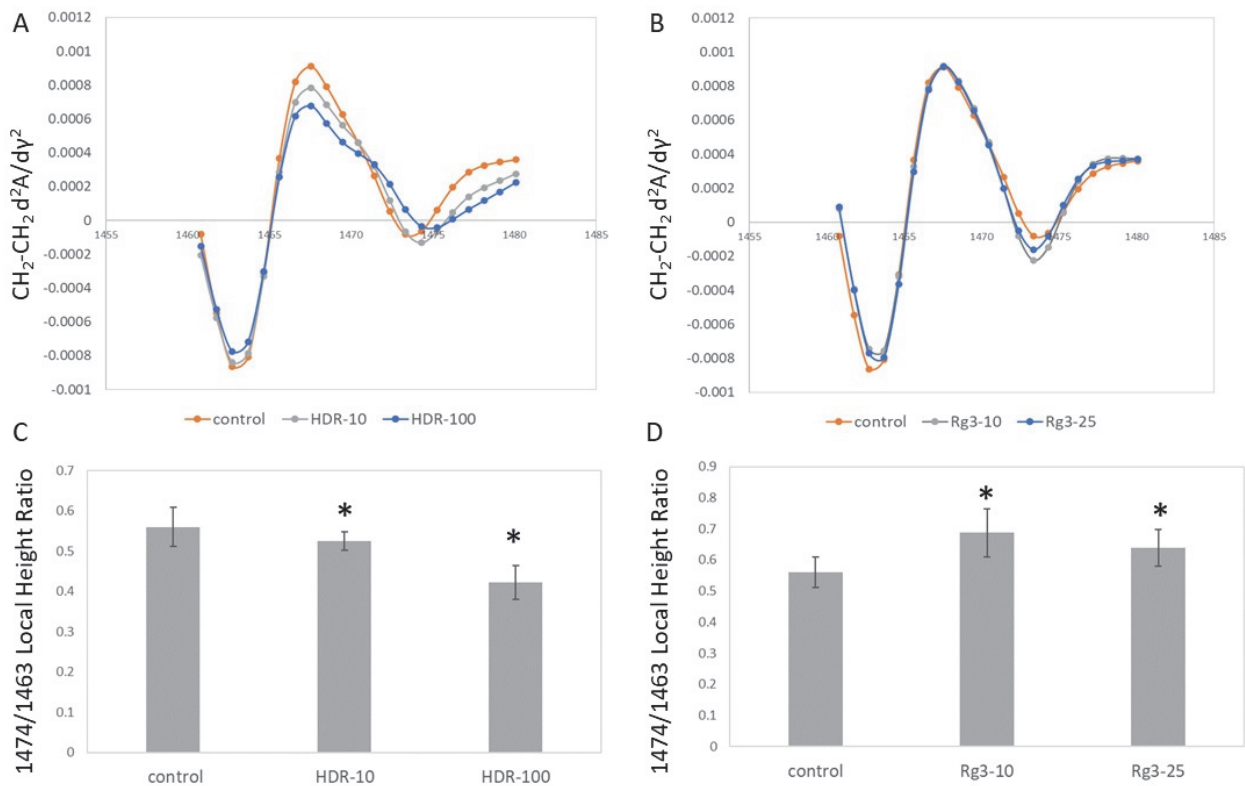


Figure 3. Analysis of changes in skin lipid structure according to 3D skin culture formulation. ($p < 0.05$)

3D skin cultures were treated with hydrocortisone (HDR) at concentrations of 10 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$, Rg3 at concentrations of 10 $\mu\text{g/mL}$ and 25 $\mu\text{g/mL}$. Subsequently, the packing structures of the lipid were detected by FT-IR. Scissoring band of HDR treated 3D cells (A) and Rg3 treated cells (B). 1474/1463 local height ratio of HDR treated 3D cells (C) and Rg3 treated cells (D) were calculated.

간 지질성분의 CH₂-CH₂ scissoring band의 FT-IR분석을 실시하였다. 3D피부의 멤브레인 상부의 표피구조를 분석하기 위해서 insert로부터 멤브레인을 절단하였다. 그 후 멤브레인 상부의 표피 구조를 대상으로 분석을 실시하였다. 장벽의 구조가 약화될수록 orthorhombic구조의 특징 밴드인 1474 cm⁻¹의 감소를 수치화 하기 위해서 1474/1463의 local height비율을 계산하였다[19]. 그 결과 대조군에서는 0.56 ± 0.05의 비율을 나타내었다. 이때 Rg3를 10 µg/mL 3D피부 처리한 경우 및 25 µg/mL처리한 경우에는 0.68 ± 0.08, 0.64 ± 0.06을 나타내어 orthorhombic구조의 비율이 모두 유의미하게 증가하는 것을 관찰하였다(Figure 3B, D). 같은 조건에서 하이드로코르티손을 10 µg/mL과 100 µg/mL으로 처리한 경우에는 0.52 ± 0.02 및 0.42 ± 0.04를 나타내었다(Figure 3A, C). 두 경우 모두 유의미하게 orthorhombic구조의 비율이 감소하였다. 이를 통해서 3D 표피가 분화하는 과정에서 Rg3의 영향에 의해서 피부의 장벽 구조의 패킹이 강화되는 것을 확인하였다. 또한 하이드로코르티손의

처리에 의해서 orthorhombic구조의 비율이 감소하였다. 이를 통해서 TEWL평가에서 나타난 장벽의 기능 변화가 장벽 구조의 변화와 연관되어 있을 것으로 예상된다.

3.3. Rg3처리에 의한 지질 합성 효소의 변화

Rg3의 표피세포의 분화과정에서의 배양은 배양 미디어에 이루어지고 그 농도 또한 낮기 때문에 그 성분 자체가 장벽의지질 구조에 영향을 주는 가능성은 낮고 분화과정의 생리적인 변화에 기인할 가능성이 높다. Rg3에 의해서 생리적인 변화의 과정을 확인하기 위해서 표피 세포인 HaCaT세포를 대상으로 Rg3 처리에 의한 변화를 확인하였다. RNA sequencing에 의해서 선정된 타겟 유전자의 변화를 정량적으로 확인하기 위해서 q-RT-PCR을 통해서 수치화 하였다. Rg3를 10 µg/mL과 25 µg/mL을 처리한 조건에서 RNA를 수득하였고 RNA sequencing을 통해서 선정된 4가지 유전자의 발현을 beta-actin에 대한 상대적인 발현 변화로 검증하였다.

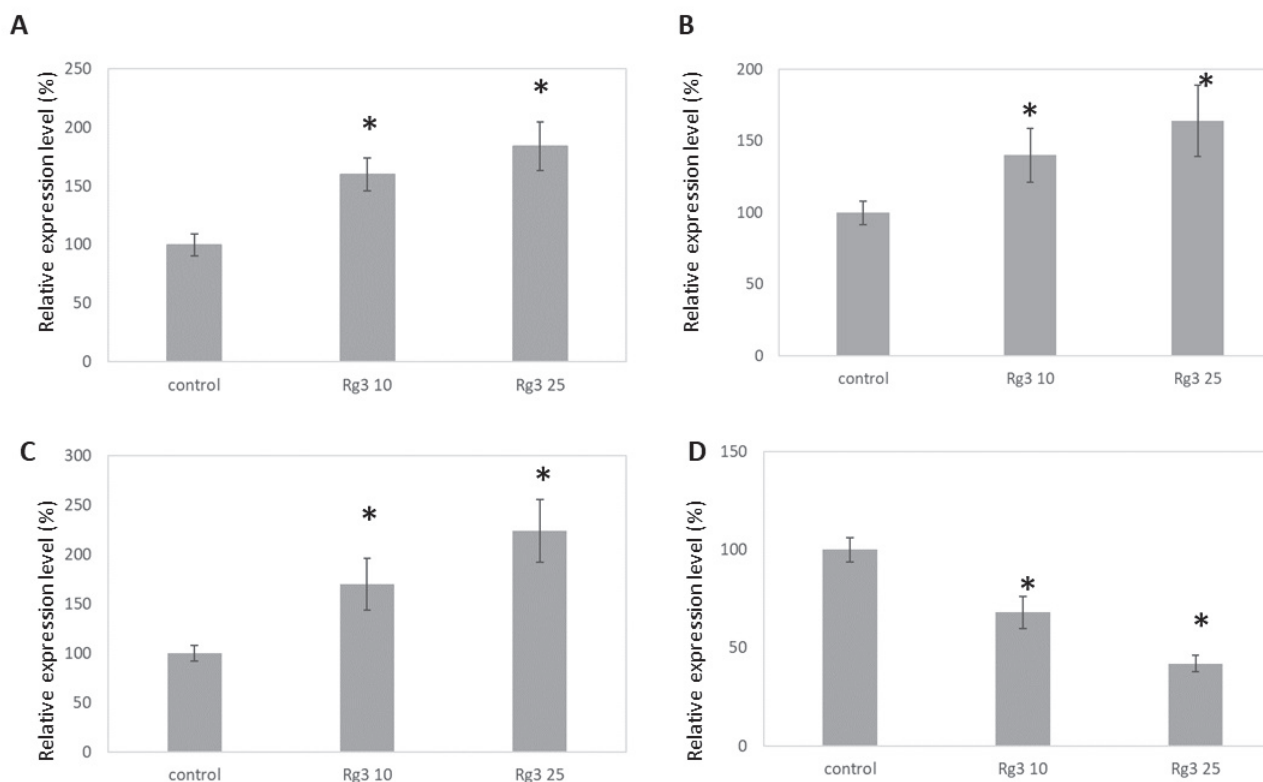


Figure 4. Analysis of gene expression changes related to lipid synthesis in HaCaT cell. (* $p < 0.05$)

HaCaT cell culture were treated Rg3 at concentrations of 10 µg/mL and 25 µg/mL. Subsequently, Changes in genes related to lipid synthesis were analyzed by Q-RT-PCR compared to beta-actin. A: ELOV 1, B: ELOVL 4, C: ACER 3, D: CERS6

그 결과 우선 긴 길이의 자유 지방산을 합성하는 효소인 elongation of very-long-chain-fatty acids (ELOVL 1)과 elongation of very-long-chain-fatty acids (ELOVL 4)의 발현이 Rg3를 처리한 경우 증가하였다. ELOVL 1의 경우 대조군 100% 발현량 대비 $160 \pm 14\%$ 및 $184 \pm 21\%$ 로 증가하였다(Figure 4A). 또한 ELOVL 4의 경우 대조군 100% 발현량 대비 $140 \pm 19\%$ 및 $134 \pm 25\%$ 로 증가하였다(Figure 4B). 또한 피토스핑고신 구조의 세라마이드를 선택적으로 분해하는 alkaline ceramidase 3 (ACER3)의 유전자는 대조군 대비 $170 \pm 26\%$ 및 $224 \pm 32\%$ 로 유의미하게 증가하였다(Figure 4C). 그러나 짧은 길이의 세라마이드를 합성하는데 관여하는 ceramide synthase 6 (CERS6)의 경우는 대조군 대비 $68 \pm 8.2\%$ 및 $42 \pm 4.3\%$ 으로 감소하였다(Figure 4D).

이를 통해서 Rg3가 표피세포의 지질 합성 유전자의 발현과정에 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다.

4. 결론

각질형성 세포가 분화하면서 새롭게 합성되는 피부장벽의 세포간 지질은 장벽의 기능에 중요한 역할을 한다. 이때 개인간의 유전적 차이나 외부의 환경에 의해서 그 조성이 달라지고 장벽의 기능 또한 변화한다. 스트레스 등의 요인으로 생성되는 코르티솔의 분비 혹은 아토피성 피부를 치료하기 위해 도포하는 스테로이드성 호르몬에 의해서 장벽기능이 약화된다고 보고되고 있다[20]. 또한 아토피성 피부를 가지는 사람에게서 세라마이드 합성의 변화가 관찰되는 등 다양한 사례에서 보고되고 있다[21]. 따라서 생리적 요인에 의한 지질 합성 형태의 변화를 조절하는 것은 외부에서 세라마이드와 같은 지질을 공급해 주는 것 시너지를 이룰 수 있는 독립적인 장벽 개선 방법중의 하나이다.

본 연구에서는 홍삼의 주요한 효능성분인 진세노사이드를 대상으로 생리적인 변화를 유발하여 장벽의 기능을 강화할 수 있는지 확인하려 하였다. 또한 이것이 지질의 패킹구조를 분석하여 orthorhombic 구조의 강화를 가져오는 것을 추가로 검증하였다. 이를 위해서 우선 홍삼의 형성과정에서 생성되는 진세노사이드 Rg3와 Rh1 성분을 각질형성 세포인 HaCaT세포에 처리 후 RNA sequencing을 수행하였다. 이를 통해서 지질 합성 관련 유전자에 변화를 주는 가능성이 있는 Rg3를 후보로 도출하였다. 이때 HaCaT 세포를 분화시키는 등의 별도의 배양조건을 구축하지는

않았다. 대신 선별된 Rg3를 표피세포가 분화되어 각질 구조가 형성되는 3D배양 시스템에서 최종적인 장벽의 구조와 기능을 확인하였다. 이때 스테로이드성 호르몬이 장벽 기능을 약화시키는 정도와 비교하기 위해서 하이드로코르티손을 두가지 농도로 처리하였다. 그 결과 하이드로코르티손을 처리한 조건에서 TEWL의 증가로 장벽이 약화되는 배양 조건인 것을 알 수 있었고, 이때 FT-IR을 통한 패킹분석의 결과 orthorhombic 패킹의 약화도 확인할 수 있었다. 이와 반대로 Rg3를 두가지 농도로 처리한 경우 TEWL가 감소하는 것을 확인하였고 또한 orthorhombic 패킹의 강화도 확인할 수 있었다. 이를 통해서 Rg3가 장벽을 강화할 수 있는 가능성을 3D피부 시스템에서 확인할 수 있었다. 하지만 3D피부 시스템은 기본 TEWL 지수로는 porcine skin과 인체와 비교해서 약한 구조를 가지고 있고 FT-IR을 통한 패킹 구조도 약화 되어있는 것을 확인할 수 있었다[17]. 3D피부 시스템을 대상으로 하는 것은 porcine skin 등의 시스템이나 실제 인체의 생리적 환경과 다를 수 있는 한계는 가지고 있다.

한편 장벽기능의 변화가 지질의 합성과정의 변화를 통해서 이루어지는 것을 보기 위해서 Rg3를 HaCaT 세포에 처리 후 확보한 RNA를 바탕으로 q-RT-PCR를 통해서 유전자의 변화를 추가로 검증하였다. 이때 EVOL1 과 EVOL4 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이들은 지방산의 길이를 증가시키는 역할을 한다. 그러나 ACER3 유전자는 세라마이드의 분해를 담당하는 효소로 피토스핑고신 구조로 가지는 세라마이드를 선택적으로 분해한다[22]. 이 유전자는 Rg3의 처리에 위해서 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 또한 짧은 길이의 지방산을 가지는 세라마이드를 합성하는 세라마이드 합성효소인 CERS6[23] 발현을 저해하는 것을 확인하였다. 이를 통해서 Rg3가 긴 길이를 가지는 지방산 및 세라마이드의 증가, 짧은 길이의 세라마이드의 감소, 피토스핑고신을 구조로 가지는 세라마이드의 감소를 가져올 것으로 추측할 수 있고 이를 통해서 지질 패킹의 변화를 가져와 장벽의 강화로 이어지는 것을 유추할 수 있다. 그러나 3D 표피세포에서 RNA를 얻어서 실제 분화과정의 유전자 발현과정을 확인하지 못한 것. 그리고 3D 표피로부터 지질의 프로파일을 분석하여 실제 변화하는 지질 등의 조성을 직접 검증하지 못한점에서 본 연구는 한계를 가지고 있다. 향후 이 방향으로 추가 연구를 진행시킬 계획이다.

그러나 본 연구를 통해서 Rg3가 표피의 분화과정에서

생리적인 변화를 통하여 피부벽의 강화를 가져올 수 있는 기능과 방식을 확인한 것은, 세라마이드 처리 등의 물리적인 처리방식과 시너지를 낼 수 있는 중요한 장벽 강화 소재의 가능성을 제시하는 의미를 가진다고 할 수 있다[24].

Acknowledgement

This thesis was supported by the Dongduk Women's University Grant.

References

1. Z. Nemes and P. M. Steinert, Bricks and mortar of the epidermal barrier, *Exp. Mol. Med.*, **31**(1), 5 (1999).
2. M. Ponc, A. Weerheim, J. Kempenaar, A. M. Mommaas, and D. H. Nugteren, Lipid composition of cultured human keratinocytes in relation to their differentiation, *J. Lipid Res.*, **29**(7), 949 (1988).
3. M. Vietri Rudan, and F. M. Watt, Mammalian epidermis: a compendium of lipid functionality, *Front. Physiol.*, **12**, 804824 (2022).
4. H. J. Cha, C. He, H. Zhao, Y. Dong, I. S. An, and S. An, Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin, *Int. J. Mol. Med.*, **38**(1),16 (2016).
5. T. Sassa, Y. Ohno, S. Suzuki, T. Nomura, C. Nishioka, T. Kashiwagi, T. Hirayama, M. Akiyama M, R. Taguchi, H. R. Shimizu, S. Itoharu, and A. Kihara, Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking elov11, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production, *Mol. Cell. Biol.*, **33**(14), 2787 (2013).
6. W. Li, R. Sandhoff, M. Kono, P. Zervas, V. Hoffmann, B. C. H. Ding, R. Proja, and C. Deng, Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice, *Int. J. Biol. Sci.*, **3**(2), 120 (2007).
7. L. E. Uche, G. S. Gooris, J. A. Bouwstra, and C. M. Beddoes, Increased levels of short-chain ceramides modify the lipid organization and reduce the lipid barrier of skin model membranes, *Langmuir*, **37**(31), 9478 (2021).
8. M. Janssens, J. Van Smeden, G. S. Gooris, W. Bras, G. Portale, P. J. Caspers, R. Vreeken, T. Hankemeier, S. Kezic, R. Wolterbeek, A. Lavrijsen, and J. Bouwstra, Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients, *J. Lipid Res.*, **53**(12), 2755 (2012).
9. P. A. Robida, A. P. Chumanovich, A. O. Gandy, J. W. Fuseler, P. Nagarkatti, M. Nagarkatti, and C. Oskeritziyan, Skin mast cell-driven ceramides drive early apoptosis in pre-symptomatic eczema in mice, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(15), 7851 (2021).
10. A. Nădăban, J. Rousel, D. El Yachoui, G. S. Gooris, C. M. Beddoes, R. M. Dalglish, M. Malfois, R. Rissmann, and A. Bouwstra, Effect of sphingosine and phytosphingosine ceramide ratio on lipid arrangement and barrier function in skin lipid models, *J. Lipid Res.*, **64**(8), 100400 (2023).
11. J. A. Bouwstra, G. S. Gooris, W. Bras, and D. T. Downing, Lipid organization in pig stratum corneum, *J. Lipid Res.*, **36**, 685 (1995).
12. M. Boncheva, F. Damien, and V. Normand, Molecular organization of the lipid matrix in intact stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1778**(5), 1344 (2008).
13. M. Damien and F. Boncheva, The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin In vivo, *J. Invest. Dermatol.*, **130**(2), 611 (2010).
14. J. M. Lee, M. J. Ko, M. S. Chung Physicochemical properties and composition of ginsenosides in red ginseng extract as revealed by subcritical water extraction, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **47**(6), 757 (2015).
15. C. J. Lim, W. Y. Choi, and H. J. Jung, Stereoselective skin anti-photoaging properties of ginsenoside Rg3 in UV-B-irradiated keratinocytes, *Biol. Pharm. Bull.*, **37**(10), 1583 (2014).
16. N. R. Han, S. G. Ko, P. D. Moon, and H. J. Park, Ginsenoside Rg3 attenuates skin disorders via down-regulation of MDM2/HIF1 α signaling pathway, *J. Ginseng Res.*, **45**(5), 610 (2021).

17. H. J. Kim, S. Kim, and S. Lee, Non-invasive skin barrier lipid packing analysis using FT-IR and study of cosmetic formulation for damaged barrier, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **46**(3), 307 (2020).
18. M. Oray, K. Abu Samra, N. Ebrahimiadib, H. Meese, and C. S. Foster, Long-term side effects of glucocorticoids, *Expert. Opin. Drug Saf.*, **15**(4), 457 (2016).
19. L. Rieppo, S. Saarakkala, T. Närhi, H. J. Helminen, J. S. Jurvelin, and J. Rieppo, Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage, *Osteoarthritis Cartilage*, **20**(5), 451 (2012).
20. L. Kolbe, A. M. Kligman, V. Schreiner, and T. Stoudemayer, Corticosteroid-induced atrophy and barrier impairment measured by non-invasive methods in human skin, *Skin Res. Technol.*, **7**(2), 73 (2001).
21. G. Imokawa, A. Abe, K. Jin, Y. Higaki, M. Kawashima, and A. Hidano, Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: an etiologic factor in atopic dry skin?, *J. Invest. Dermatol.*, **96**(4), 523 (1991).
22. C. Mao, R. Xu, Z. M. Szulc, A. Bielawska, S. H. Galadari, L. and M. Obeid, Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase: A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide, *J. Biol. Chem.*, **276**(28), 26577 (2001).
23. M. Levy and A. H. Futerman, Mammalian ceramide synthases, *IUBMB Life*, **62**(5), 347 (2010).
24. D. H. Kim, W. R. Park, J. H. Kim, E. C. Cho, E. J. An, J.-W. Kim, and S. Oh, Fabrication of pseudo-ceramide-based lipid microparticles for recovery of skin barrier function, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **94**(1), 236 (2012).